

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM

ELEKTROKINETISK MIGRASJON AV SURE LEGEMIDLER OVER EN KUNSTIG VÆSKEMEMBRAN

Marte Balchen



Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet,
Universitetet i Oslo.
Oslo 2006

ELEKTROKINETISK MIGRASJON AV SURE LEGEMIDLER OVER EN KUNSTIG VÆSKEMEMBRAN

Marte Balchen

Hovedfagsoppgaven ble gjennomført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til oktober 2006.

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Professor Knut Einar Rasmussen

Stipendiat Astrid Gjelstad

FORORD

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for god veiledning og opplæring. Jeg har satt stor pris på at du alltid har vært tilgjengelig med gode råd og for din tilstedeværelse gjennom hele hovedfagsåret.

Jeg må også takke mine to andre veiledere, professor Knut Einar Rasmussen og stipendiat Astrid Gjelstad, for god oppfølging. En spesiell takk til Astrid for veiledning på laboratoriet, morsomme samtaler på kontoret og hjelp til nesten hva det skulle være.

Til Petter, Toril, Kari og Hanne; Det har vært artig å dele kontor med dere i et år. En spesiell takk til Toril for bra samarbeid på laboratoriet, men først og fremst for mange diskusjoner om andre temaer enn farmasi.

Til slutt vil jeg takke Jan Tore for tålmodighet og forståelse for at jeg har levd litt i min egen verden de siste ukene.

Oslo, oktober 2006

Marte Balchen

INNHALDSFORTEGNELSE

1	SAMMENDRAG	5
2	FORKORTELSER.....	6
3	INTRODUKSJON	7
4	TEORI	10
4.1	ELEKTROKINETISK MIGRASJON AV LEGEMIDLER OVER KUNSTIGE VÆSKEMEMBRANER	10
5	EKSPERIMENTELT	14
5.1	KARAKTERISTIKK AV ANALYSERTE LEGEMIDLER	14
5.2	UTSTYR OG BETINGELSER FOR EMI AV SURE LEGEMIDLER	18
5.3	BETINGELSER FOR CE	19
5.4	KJEMIKALIER	19
5.5	TILLAGING AV STANDARDLØSNINGER	20
5.6	BIOLOGISKE PRØVER	20
5.7	BEREGNING AV UTBYTTE OG OPPKONSENTRERINGSFAKTOR	21
6	RESULTATER OG DISKUSJON	22
6.1	INNLEDENDE FORSØK	22
6.1.1	<i>Organisk fase.....</i>	22
6.1.2	<i>Volum donorløsning.....</i>	25
6.1.3	<i>Polypropylenfiber</i>	26
6.1.4	<i>pH i donorfase og akseptorfase</i>	26
6.1.5	<i>Spenning.....</i>	29
6.1.6	<i>Tid.....</i>	31
6.1.7	<i>Vibrasjon.....</i>	32
6.1.8	<i>Temperatur.....</i>	34
6.1.9	<i>Massebalanse.....</i>	34
6.2	UTBYTTE OG OPPKONSENTRERINGSFAKTOR I ET OPTIMALT SYSTEM.....	35
6.3	EVALUERING.....	37
6.4	BIOLOGISKE PRØVER	39
6.4.1	<i>Ekstraksjon fra urin</i>	40
6.4.2	<i>Ekstraksjon fra plasma.....</i>	43
7	KONKLUSJON.....	45
8	REFERANSELISTE.....	46

1 SAMMENDRAG

Elektrokinetisk migrasjon av sure legemidler over en kunstig væskemembran er blitt vist for første gang. Legemidlene ble ekstrahert fra en vandig, basisk donorfase (300 µl), over en tynn, kunstig væskemembran immobilisert i en porøs hulfiber, og inn i en vandig, basisk akseptorfase (30 µl) i fiberens hulrom ved å sette på spenning over systemet. Den negative elektroden ble plassert i donorfasen, og den positive elektroden ble plassert i akseptorfasen. Forholdene i donorfasen og akseptorfasen ble optimalisert for at legemidlenes vandring over den kunstige væskemembranen skulle bli best mulig. Andre parametre, som organisk fase, spenning, tid og vibreringshastighet, ble også undersøkt. Optimale ekstraksjoner ble oppnådd med 1-heptanol som organisk fase, pH 12,0 i både donor- og akseptorfasen og med 50 volt som den drivende kraften. Hele systemet ble vibrert i 5 minutter med en hastighet på 1200 rpm for best resultat. 11 forskjellige sure legemidler ble ekstrahert med utbytter fra 8-100 %. Repeterbarheten varierte mellom de ulike analyttene. For legemidlene med høyest utbytter (> 60 %) var RSD < 12 %. For legemidlene med lavere utbytter (< 48 %) ble repeterbarheten noe svakere. Det ble også vist en lineær sammenheng mellom opprinnelig donorkonsentrasjon og avsluttende akseptorkonsentrasjon for tre av stoffene. Konsentrasjonsområdet var 0,1 – 2,5 µg/ml og lineariteten (r^2) var 1,00 for det første stoffet, 0,98 for det andre stoffet og 0,96 for det tredje stoffet.

Det ble også eksperimentert med å benytte biologiske matrikser i donorløsningen. Forsøk ble gjort på både urin og plasma. Mer forskning er nødvendig før sure legemidler kan ekstraheres og isoleres fra disse væskene.

2 FORKORTELSER

NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
2-NPOE	2-Nitrofenyloktyleter
CE	Kapillærelektroforese
EMI	Elektromembranisolasjon
LLE	Liquid Liquid Extraction (Væske-væske ekstraksjon)
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (Væskefasemikroekstraksjon)
SLM	Supported Liquid Membrane
SPE	Solid Phase Extraction (Fast-fase ekstraksjon)
UV	Ultrafiolett
rpm	Rotasjoner per minutt
i.d	Indre diameter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligram
µg	Mikrogram
mM	Millimolar
RSD	Relativt standardavvik
V	Volt

3 INTRODUKSJON

Det finnes flere ulike teknikker for opprensing og oppkonsentrering av kjemiske stoffer innen farmasøytisk bioanalyse. To av de mest brukte teknikkene er væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE). LLE baserer seg på egenskapen organiske stoffer har til å fordele seg mellom to ikke-blandbare væsker. Den ene væsken er vandig (ofte en biologisk væske) mens den andre består av et organisk løsningsmiddel. SPE baserer seg på et stoffs fordeling mellom en væske og overflaten av et fast materiale [1, 2].

De siste ti årene har det vært en økende interesse for miniatyrisering av analytiske væske-væske ekstraksjoner (LLE). Større krav til automatisering, raskere ekstraksjoner og redusert bruk av organiske løsningsmidler i analysearbeidet førte til utviklingen av væskefase-mikroekstraksjon (LPME). Det første LPME-formatet ble introdusert i 1996 og baserte seg på en dråpe organisk løsningsmiddel hengende i spissen av en mikrosprøyte [3-6]. Den organiske dråpen ble plassert i en vandig prøveløsning, og analyttene i prøveløsningen ble ekstrahert over i den organiske dråpen basert på passiv diffusjon. Etter ekstraksjonen ble dråpen trukket opp i mikrosprøyten, sprøyten ble overført til en gasskromatograf (GC), og dråpen med analytter ble injisert i GCen.

LPME-formatet fra 1996 var lite robust [7]. Den organiske dråpen kunne løsne fra sprøytespissen under ekstraksjonen, og analysen måtte gjøres på nytt. Dette var særlig tilfelle dersom prøveløsningen ble vibrert som et forsøk på å øke ekstraksjonshastigheten. Forskning ble gjort for å utvikle og forbedre konseptet. I 1999 ble et nytt LPME-format introdusert, basert på bruken av en porøs hulfiber av polypropylen [8]. Dette formatet var mer robust fordi mikroekstraktet ble plassert i fiberens hulrom, og var på denne måten atskilt fra prøveløsningen. Kraftig vibrering av prøveløsningen førte dermed ikke til tap av mikroekstraktet over i prøveløsningen, slik tilfelle var for formatet fra 1996. I det nye formatet ble analyttene ekstrahert fra en vandig prøveløsning (donorfase), gjennom et organisk løsningsmiddel immobilisert i porene i polypropylenfiberen (organisk fase), og inn i en ny vandig løsning (akseptorfase) i fiberens hulrom. Det organiske løsningsmiddelet utgjorde en kunstig væskemembran (SLM), og denne væskemembranen var i direkte kontakt med både den vandige prøveløsningen og den vandige akseptorløsningen.

Det nye LPME-formatet baserte seg på passiv diffusjon av analyttene som transportmekanisme over væskemembranen. Ekstraksjonshastigheten var avhengig av flere parametere; analyttens distribusjonskonstanter, volum av donor- og akseptorfase, vibrasjonshastigheten og arealet av væskemembranen. Selv med optimale betingelser var ekstraksjonstider på 30 til 60 minutter vanlig [9, 10].

Ønsket om kortere analysetider førte til videre forskning for å forbedre LPME-formatet fra 1999. Nylig har det blitt utviklet et nytt konsept basert på elektrokinetisk migrasjon [11]. Konseptet ble kalt elektromembranisolasjon (EMI) og baserte seg på kunnskapen om at ladde, kjemiske stoffer migrerer i en løsning ved tilførsel av elektrisk spenning. EMI ble vist for første gang i 2005 for fem basiske legemidler. Elektroekstraksjon som teknikk har tidligere blitt utført i både 2- og 3-fase-systemer [12, 13]. Dette var som regel systemer der væskefasene var i bevegelse (såkalte flow-systemer) [14] og stoffene som ble ekstrahert var ofte metaller [15]. EMI skilte seg fra disse systemene ved at den elektrokinetiske migrasjonen her foregikk i et 3-fase-system der en kunstig væskemembran skilte to stillestående faser fra hverandre. I tillegg var stoffene som migrerte organiske molekyler. I EMI-konseptet fra 2005 migrerte de fem basiske legemidlene fra en donorfase, over en kunstig væskemembran (organisk fase) og inn i en akseptorfase. To elektroder, en i donorfasen og en i akseptorfasen, førte spenning gjennom systemet. pH i donor- og akseptorfase ble regulert slik at stoffene som skulle migrere var på ionisert form. Mye forskning er gjort det siste året for å øke kunnskapene om denne nye ekstraksjonsmetoden. Fokuset har vært på grunnleggende parametere som analysetid, styrke på det elektriske potensialet, pH i donor- og akseptorfase og testing av forskjellige kunstige væskemembraner for ulike typer basiske legemidler. Det har vist seg at væskemembranens kjemiske egenskaper spiller en viktig rolle for hvilke stoffer som klarer å migrere fra donorfase, over membranen og inn i akseptorfase.

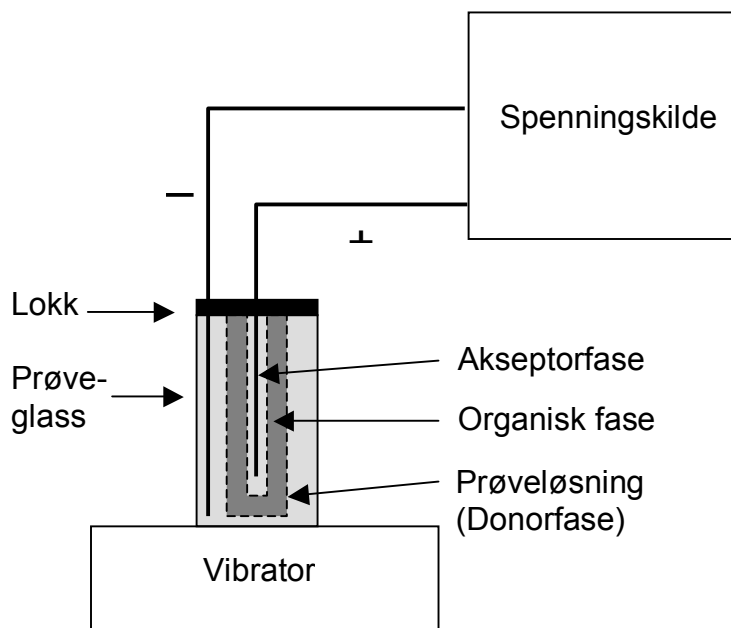
Kunnskapen om EMI er fremdeles begrenset. Frem til nå er alt arbeid utført på basiske legemidler [11, 16], mens ingen data er rapportert fra EMI av sure forbindelser. For å øke den grunnleggende forståelsen av EMI fokuserte denne oppgaven på elektrokinetisk migrasjon av sure legemidler. Det overordnede målet med oppgaven var å undersøke om det var mulig å ekstrahere sure legemidler over kunstige væskemembraner. Dersom det ble observert legemidler i

akseptorfasen, bestod resten av oppgaven i å optimalisere betingelsene for EMI slik at ekstraksjonsutbyttet av de sure stoffene ble høyest mulig. Kunnskap fra EMI av basiske legemidler, men også LPME av sure legemidler [17], ble brukt som utgangspunkt for oppgaven. Endring av betingelser, hovedsakelig i de tre fasene, stod i fokus. Flere andre parametre ble også undersøkt. Optimaliseringen av systemet skjedde ved forsøk på vandige løsninger av legemidlene. Det optimale systemet ble til slutt evaluert med hensyn på repeterbarhet og linearitet. Utbytte og oppkonsentreringsfaktor for flere sure legemidler ble undersøkt. Det ble også forsøkt å ekstrahere sure legemidler fra urin og plasma.

4 TEORI

4.1 *Elektrokinetisk migrasjon av legemidler over kunstige væskemembraner*

EMI er en prøveopparbeidelsesmetode som er utviklet for raskt å kunne isolere og oppkonsentrere ladde kjemiske substanser med en minimal bruk av organiske løsningsmidler [11]. Det har de siste årene vært en økende interesse i bruken av kunstige væskemembraner i kjemisk analysearbeid, og EMI er et nytt konsept innen dette feltet.



Figur 4.1: Ekstraksjonsenhet for EMI

Oppsettet for elektrokinetisk migrasjon er vist i figur 4.1. Ekstraksjonsenheten er bygd opp av et prøveglass med et lokk der det er laget et stort og et lite hull. En porøs hulfiber festet til en pipettespiss er ført gjennom det store hullet i lokket. En platinaelektrode er plassert i fiberens

hulrom. En annen platinaelektrode er ført gjennom det lille hullet i lokket. Begge platinaelektroderne er koblet til en spenningskilde. Før ekstraksjon overføres prøveløsningen (donorfase) til prøveglasset. Løsningen har en pH som gjør at analytten som skal ekstraheres er på ionisert form. Hulfiberen immobiliseres med et organisk løsningsmiddel som utgjør den kunstige væskemembranen. Fiberens hulrom fylles med en vandig akseptorfase, og pH er også her regulert slik at analytten vil være på ionisert form i løsningen.

For å oppnå elektrokinetisk migrasjon må ekstraksjonsenheten fremstå som en elektrisk krets. Både donorfase, den kunstige væskemembranen (organisk fase) og akseptorfase må kunne lede elektrisk strøm. Ikke uventet er det væskemembranen som utøver størst elektrisk motstand, og valg av organisk løsningsmiddel er derfor kritisk for å sikre elektrisk ledningsevne i hele kretsen. Løsningsmidlet som velges bør ha en viss polaritet eller et vanninnhold som gjør at væskemembranen kan lede strøm. Høy strømføring trenger likevel ikke bety økte ekstraksjonsutbytter av analyttene. Forutsatt at væskemembranen og analyttene er inerte overfor elektrodereaksjoner vil følgende skje ved elektrodene i donor- og akseptorløsningen:

Negativ elektrode: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Positiv elektrode: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^-$

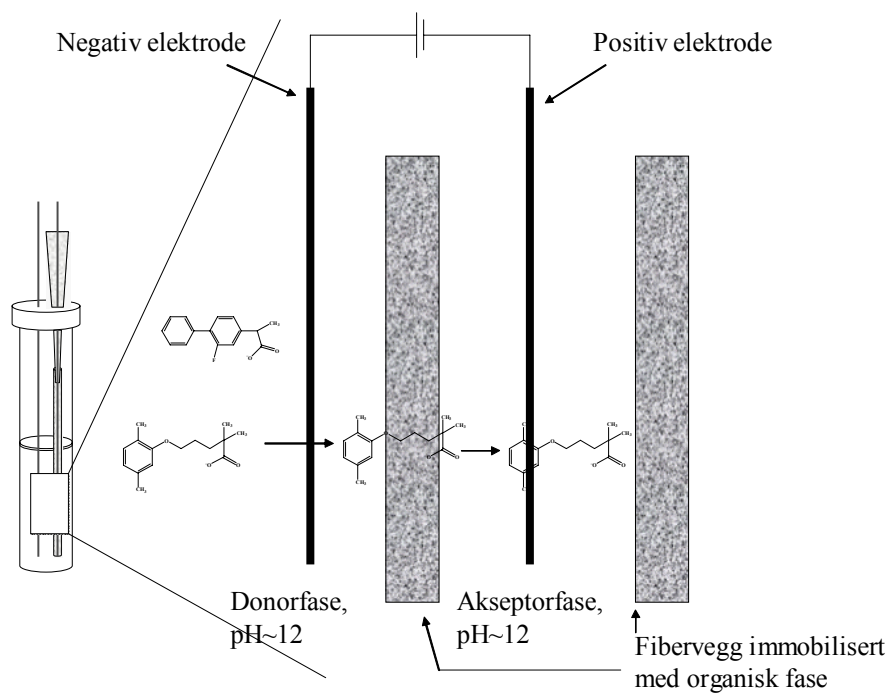
O_2 og H_2 blir dannet ved de to elektrodene, og denne bobledannelsen øker ved økt strømføring i væskemembranen. For å unngå bobledannelse bør derfor strømføringen i væskemembranen ikke være for høy, men heller et kompromiss mellom ekstraksjonseffektivitet og minst mulig bobledannelse.

Valget av organisk løsningsmiddel er også avhengig av analyttenes kjemiske egenskaper. Et stoffs ladning og log P-verdi er faktorer som påvirker hvorvidt stoffet vil kunne migrere fra donorfase til akseptorfase over en gitt væskemembran. Som eksempel er 2-nitrofenyloktyleter (2-NPOE) en væskemembran som gir høye ekstraksjonsutbytter for hydrofobe, basiske legemidler ($\log P > 2,0$), men kan for hydrofile, basiske legemidler ($\log P < 1,0$) gi svært lave, eller ingen ekstraksjonsutbytter [16]. Forsøk har vist at de mest hydrofile legemidlene ($\log P <$

0,4) hovedsakelig befant seg i donorfase etter endt ekstraksjon med denne membranen. De var altså for hydrofile til å vandre inn i en organisk fase av 2-NPOE, og grenseflaten mellom donorfase og organisk fase ble en barriere for disse stoffene. I det samme forsøket fordelte legemidlene med en log P-verdi på 1,0 seg både i donorfase og organisk fase, men ikke i akseptorfase. Dette kunne tyde på at for disse stoffene virket også grenseflaten mellom organisk fase og akseptorfase som en barriere. For de mest hydrofobe stoffene ($\log P > 2,4$) fordelte massen som ikke ble detektert i akseptorfase seg likt mellom donorfase og den organiske fasen. Det er med andre ord motstand mot massetransport på begge sider av den kunstige væskemembranen. Denne motstanden kan reduseres ved å endre kjemien i membranen. Ved å tilsette ulike stoffer, som alkylerte fosfater, til det organiske løsningsmiddelet har forsøk vist at det er mulig å utvikle væskemembraner som tillater migrasjon av stoffer fra donorfase til akseptorfase selv om stoffenes log P-verdier varierer fra -1,3 til 5,7 [16]. Bakgrunnen for dette er at de negativt ladde fosfatene danner et kompleks med de positivt ladde analyttene i prøveløsningen via ionparbindinger. Dette komplekset blir tilstrekkelig hydrofobt til å vandre inn i porene i den organiske fasen. På denne måten fungerer ionpardanneren som et transportmolekyl som kan fremme transport av de hydrofile, basiske legemidlene.

EMI baserer seg på at ladde stoffer i prøveløsningen vil tiltrekkes av den motsatt ladde elektroden i akseptorløsningen, se figur 4.2. Det er viktig at analyttene er på ionisert form i både donorfase og akseptorfase. Analyttens pK_a -verdier påvirker derfor valget av pH i disse to fasene. Basiske legemidler (B) må ekstraheres fra en sur donorfase til en sur akseptorfase for å være fullstendig protonert (BH^+), mens sure legemidler ($COOH$) trenger et basisk medium for å være fullstendig uprotonert (COO^-).

Vibrasjonshastighet, styrken på spenningen og varighet av ekstraksjonen er tre andre faktorer som har stor betydning for resultatet av EMI. Dersom disse faktorene optimaliseres, den kunstige væskemembranen er tilpasset analyttene som skal ekstraheres og betingelsene i donor- og akseptorfase er gode, kan ekstraksjonsutbyttene for EMI bli svært høye.



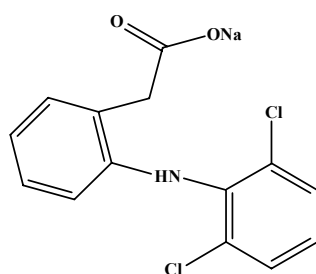
Figur 4.2: Prinsipper for transport av legemidler i EMI

5 EKSPERIMENTELT

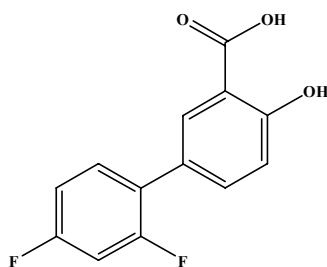
5.1 Karakteristikk av analyserte legemidler

Strukturformlene til de sure legemidlene som ble benyttet som modellanalytter er vist i figur 5.1. Tabell 5.1 gir en oversikt over modellanalyttens molekylformel, molekylvekt, pK_a - og log P verdier (oktanol-vann distribusjons-konstanter).

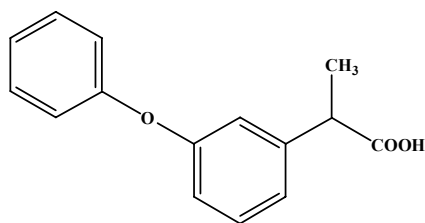
Diclofenac



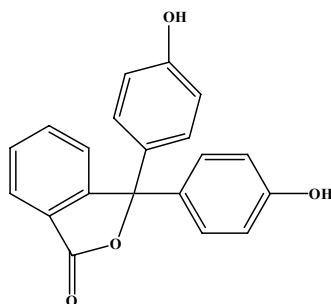
Di flunisal



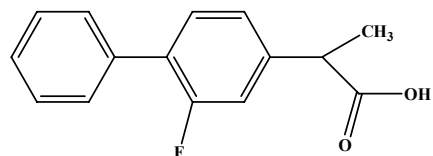
Fenoprofen



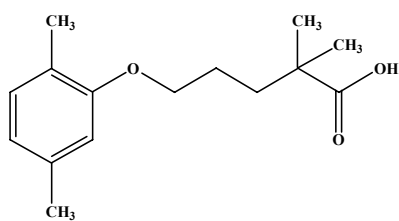
Fenolftalein^a



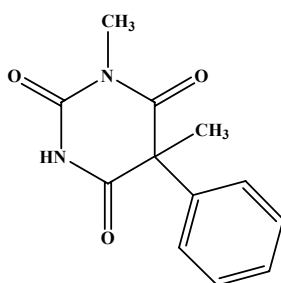
Flurbiprofen



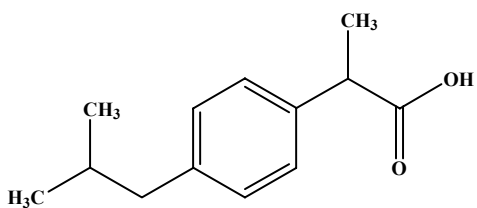
Gemfibrozil



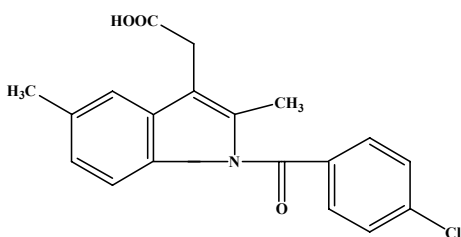
Hexobarbital



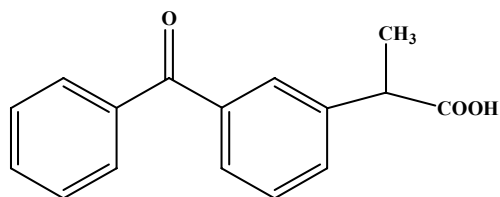
Ibuprofen



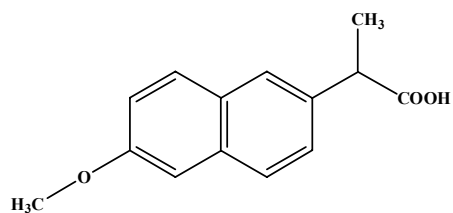
Indometacin



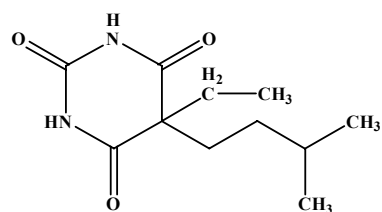
Ketoprofen



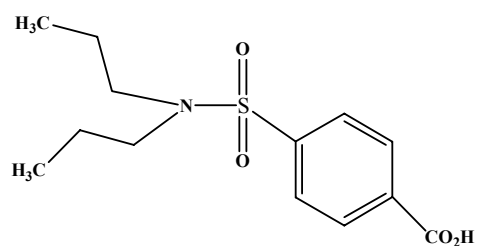
Naproxen



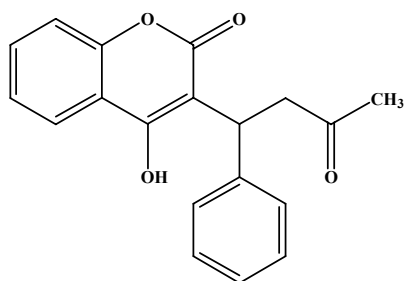
Pentymal



Probenecid



Warfarin

**Figur 5.1: Modellanalyttenes strukturformler**^a(indikator)

Tabell 5.1: Oversikt over modellanalyttene

Analytt	Molekylformel	Mw	pKa	log P
Diclofenac ¹	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,2	4,2	4,5
Diflunisal ²	C ₁₃ H ₈ F ₂ O ₃	250,2	2,9	4,3
Fenoprofen ¹	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242,3	4,5	0,8
Fenolftalein ²	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318,3	9,3	3,3
Flurbiprofen ²	C ₁₅ H ₁₃ FO ₂	244,3	4,1	4,1
Gemfibrozil ²	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250,3	4,8	4,4
Hexobarbital ¹	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236,3	8,2	2,0
Ibuprofen ¹	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,3	4,4	4,0
Indometacin ¹	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8	4,5	-1,0
Ketoprofen ²	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,3	4,2	2,8
Naproxen ¹	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,3	4,2	3,2
Pentymal ²	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	226,3	7,9	2,1
Probenecid ¹	C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	285,4	3,4	3,2
Warfarin ¹	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,3	5,0	2,6

¹pKa og log P er hentet fra Clarke Analysis of Drugs and Poisons (Third edition, Pharmaceutical Press, London)

²pKa og log P er kalkulert ved bruk av dataprogramvare fra ACD labs (Toronto, Canada)

5.2 Utstyr og betingelser for EMI av sure legemidler

Figur 4.1 viser hva slags utstyr som ble brukt under ekstraksjonen. Spenningskilden var en modell ES 0300-0,45 fra Delta Power Supplies (Delta Electronika, Zierikzee, Nederland) der spenningen kunne innstilles fra 0 til 300 V, og strømmen varieres i området 0 til 450 mA. Platinatråder med en diameter på 0,5 mm (K. Rasmussen, Hamar, Norge) ble koblet til spenningskilden og brukt som elektroder i donorfasen og akseptorfasen. Et 1,5 ml mikrosentrifugerør (med lokk) av polypropylen (nummer 780500) fra Brand (Wertheim, Tyskland) ble brukt som prøveglass. Den organiske fasen ble immobilisert i en porøs hulfiber, PP Q3/2 polypropylen hulfiber (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med en indre diameter på 1,2 mm, veggtykkelse på 200 μm og en porestørrelse på 0,2 μm . Før hulfiberen kunne brukes til ekstraksjon, ble den vasket med aceton i 15 minutter i et ultralydbad. Dette ble utført to ganger for å fjerne forurensninger og sure tilsetningsstoffer i fiberen. Til slutt ble fiberen lufttørket i en time. Under forsøkene ble hele ekstraksjonsenheten ristet med en Vibramax 100 vibrator (Heidolph, Kelheim, Tyskland).

EMI ble utført etter følgende prosedyre; 300 μL basisk prøveløsning ble fylt oppi det 1,5 ml store prøveglasset (donorfase). Polypropylenfiberen ble klippet opp i fragmenter på 3,1 cm. Disse ble lukket i den ene enden ved mekanisk trykk, mens de i den andre enden ble festet til en 2,2 cm lang pipettespiss av polypropylen (Finntip 200 Ext fra Thermo Electron, Vantaa, Finland). Deretter ble 21 μL organisk løsningsmiddel injisert i fiberens hulrom med en mikrosprøyte. Løsningsmidlet fylte opp hulrommet nederst i fiberen (omtrent en tredjedel av fiberens totale hulrom). Den samme mikrosprøyten ble så benyttet til å injisere 30 μL basisk akseptorløsning i hulrommet. Ved tilførsel av akseptorløsning ble det organiske løsningsmidlet skjøvet oppover og ut mot fiberens vegg. Løsningsmidlet ble på denne måten immobilisert i porene i hulfiberens vegg, og det ble dannet en kunstig væskemembran. Akseptorløsningen fylte samtidig opp hele fiberens hulrom med væske. Hulfiberen og pipettespissen ble deretter ført gjennom et hull som var laget i lokket til prøveglasset. Den positive elektroden ble plassert i akseptorløsningen. Hulfiberen med akseptorløsning og elektrode ble plassert i prøveglasset og lokket ble festet. Den negative elektroden ble ført gjennom et lite hull i lokket og plassert i prøveglasset ved siden av

fiberen. Ekstraksjonsenheten ble plassert på en vibrator, og spenning (50 V) ble tilført for å oppnå elektrokinetisk migrasjon. Etter fem minutter ble spenningskilden og vibratoren stoppet, og akseptorløsningen ble trukket ut av hulfiberen med en mikrosprøyte for videre injeksjon i CE-apparatet.

Lengden på hvert polypropylenfiberfragment ble beregnet slik at en akseptorløsning med et volum på 30 μL skulle fylle hele fiberens hulrom. Polypropylenfiberens lengde, indre diameter, veggtykkelse og porestørrelse ble deretter benyttet til å beregne mengden organisk løsningsmiddel som var nødvendig for å utgjøre den kunstige væskemembranen.

5.3 *Betingelser for CE*

Alle akseptorløsningene ble analysert med kapillærelektroforese for innhold av legemiddelsubstanser. Kapillærelektroforesen ble utført med et MDQ instrument (Beckman, Fullerton, CA, USA) utstyrt med en UV-detektor. Et 75- μm -i.d. fused-silika kapillær med en effektiv lengde på 50 cm (Beckman) ble brukt for å separere legemidlene fra hverandre. Separasjonsbufferen var en 100 mM boratbuffer med pH 9,5. Apparatet ble kjørt med en spenning på 20 kV, noe som gav en strøm på omtrent 55 μA . Prøvene ble innført med hydrodynamisk injeksjon på 0,5 psi i 5 s. Deteksjonen ble utført på 200 nm ved bruk av en 100 x 800 μm slit.

5.4 *Kjemikalier*

Diclofenac, diflunisal, fenoprofen, flurbiprofen, gemfibrozil, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, probenecid og warfarin var alle fra Sigma (St. Louis, MO, USA). Hexobarbital var fra Norsk Medisinaldepot (Oslo, Norge). Naproxen var fra Aldrich (Steinheim, Tyskland). Pentymal hadde ukjent leverandør. Brombenzen, caprylsyre, cyclopentanol, m-kresol, diheksyleter, dodecylacetat, 1-heksanol, 1-isopropyl-4-nitrobenzen, 2-nitrofenyloktyleter, 2-oktanon, nitrobenzen, tetraoktylammoniumbromid, tetrabutylammoniumfosfat, toluen, tridecylfosfat og triheksylamin

var fra Fluka (Buchs, Sveits). 1-dekanol, 1-heptanol, 1-nonanol og 1-oktanol var fra Sigma. Urea var fra Fluka. Urinsyre var fra Aldrich. Fenolftalein var fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Anisole og natriumhydroksid var fra VWR International (Pode, England). Boratbufferen var fra Mallinckrodt (Paris, Kentucky, USA). Kreatinin og natriumklorid var fra Sigma. Resten av de uorganiske kjemikaliene var fra Merck. Etanol var fra Arcus (Oslo, Norge).

5.5 Tillaging av standardløsninger

Tørrstoff av legemidlene ble veid ut og løst i etanol til 1 mg/ml. Disse standardløsningene ble oppbevart i romtemperatur beskyttet mot lys. Nye prøveløsninger ble laget på analysedagen ved å fortynne standardløsningene med 10 mM NaOH.

Det ble laget standardløsninger av tre ulike stoffblandinger og fem enkeltstoffer:

Stoffblanding 1:	Diflunisal, fenolftalein ^a , hexobarbital og pentymal.
Stoffblanding 2:	Ketoprofen, naproxen og warfarin.
Stoffblanding 3:	Flurbiprofen, gemfibrozil og probenecid.
Enkeltstoffer:	Diclofenac, fenoprofen, hexobarbital, ibuprofen og indometacin.

^a(indikator)

5.6 Biologiske prøver

Urin fra en frivillig person og humant plasma fra Ullevål universitetssykehus (Oslo, Norge) ble brukt i prøveløsningene. Humant plasma ble oppbevart i fryser, ved -32 °C, og tint på analysedagen. Nye prøveløsninger ble laget på analysedagen ved at 150 µL av henholdsvis urin og plasma ble tilsatt 150 µL standardløsning fortynnet med 20 mM NaOH.

5.7 *Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor*

Utbyttet (R) av EMI defineres etter følgende ligning:

$$R = n_{a, \text{endelig}} / n_{d, \text{initie}} \cdot 100\% = (V_a / V_d) \cdot (C_{a, \text{endelig}} / C_{d, \text{initie}}) \cdot 100\%$$

der $n_{d, \text{initie}}$ og $n_{a, \text{endelig}}$ er antall molekyler av analytten som opprinnelig var til stede i donorløsningen og antall molekyler av analytten som var til stede i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon. V_a og V_d er volum av henholdsvis akseptorløsning og donorløsning. $C_{a, \text{endelig}}$ er konsentrasjonen av analytten i akseptorløsningen og $C_{d, \text{initie}}$ er den opprinnelige konsentrasjonen av analytt i donorløsningen.

Oppkonsentreringsfaktoren (E) beregnes etter følgende ligning:

$$E = C_{a, \text{endelig}} / C_{d, \text{initie}}$$

6 RESULTATER OG DISKUSJON

Strukturformelen til de sure legemidlene som ble benyttet i oppgaven er vist i figur 5.1. Molekylformelen er vist i tabell 5.1 sammen med legemidlenes molekylvekt, pK_a - og $\log P$ verdier. Oppsettet for elektrokinetisk migrasjon er illustrert i figur 4.1. En 300 μL vandig løsning med sure legemidler (donorløsning) ble fylt i prøveglasset. Løsningen ble gjort basisk for at analyttene skulle være på ionisert form. En nøyaktig klippet bit (3,1 cm) av polypropylenfiberen ble brukt i hver ekstraksjon. Først ble 21 μL organisk løsningsmiddel fylt i fiberens hulrom med en mikrosprøyte. Den samme mikrosprøyten ble så benyttet til å injisere 30 μL basisk akseptorløsning i hulrommet. Ved tilførsel av akseptorløsning ble det organiske løsningsmidlet immobilisert i porene i hulfiberens vegg, og det ble dannet en kunstig væskemembran. Den positive elektroden ble plassert i akseptorløsningen. Deretter ble hulfiberen med akseptorløsning og elektrode plassert i prøveglasset. Den negative elektroden ble plassert i prøveglasset ved siden av fiberen og de to elektrodene ble koblet til en spenningskilde. Ekstraksjonsenheten ble plassert på en vibrator før spenningen (50 V) ble satt på. Etter fem minutter med vibrering og spenning ble akseptorløsningen trukket ut av hulfiberen med en mikrosprøyte, og innholdet av analytter ble analysert ved kapillærelektroforese.

6.1 *Innledende forsøk*

6.1.1 Organisk fase

Valg av kunstig væskemembran spiller en vesentlig rolle for resultatet av EMI. Det organiske løsningsmiddelet som utgjør væskemembranen må som nevnt i kapittel 4.1 oppfylle to krav for at ekstraksjon skal være mulig; (1) Væskemembranen bør ha et visst dipol-moment eller elektrisk ledningsevne, og (2) den bør ha kjemiske egenskaper som gjør at analyttene kan migrere mellom de tre ulike fasene.

6.1.1.1 Forsøk med ulike kunstige væskemembraner

Som et første optimaliseringsforsøk ble 19 forskjellige organiske løsningsmidler testet ut som mulige kunstige væskemembraner. Løsningsmidlene inneholdt ulike funksjonelle grupper, og ble valgt basert på erfaring fra tidligere forsøk på kunstige væskemembraner og elektrokinetisk migrasjon [11, 16, 17]. Resultatene er vist i tabell 6.1. Blant de 19 løsningsmidlene var det bare ekstraksjonene med de langkjedete alkoholene (1-dekanol, 1-heksanol, 1-heptanol, 1-nonanol og 1-oktanol) som gav utbytter. Til tross for at flere av de andre løsningsmidlene hadde vist lovende resultater for migrasjon av basiske stoffer, ble ingen sure legemidler ekstrahert over i akseptorfasen da disse stoffene utgjorde den kunstige væskemembranen. De fem alkoholene så derimot ut til å tilfredsstille kravene som stilles til det organiske løsningsmidlet som skal utgjøre væskemembranen i EMI (se kapittel 4.1). I tillegg så alkoholene ut til å sitte godt fast i porene i hulfiberen, da det ikke ble observert noe signifikant tap av organisk fase under ekstraksjonen. Det var også en viktig egenskap.

6.1.1.2 Ionpardannere

Tilsetning av hydrofobe ionpardannere (alkylerte fosfater) til det organiske løsningsmiddelet har, som nevnt i kapittel 4.1, kunnet øke ekstraksjonsutbyttet av polare, basiske analytter ($\log P$ verdi $< 1,0$). Bakgrunnen for dette var forbedret stabilitet og elektrokinetisk mobilitet i den organiske fasen [16]. Et lignende forsøk ble testet ut på de sure legemidlene i stoffblanding 1. To positivt ladde stoffer, tetraoktylammoniumbromid og tetrabutylammoniumfosfat, ble løst i 1-heptanol i konsentrasjoner på 10 og 25 %. En spenning på 50 V ble benyttet som drivende kraft, ekstraksjonstiden var på 5 minutter og vibrasjonshastigheten var på 1200 rpm. Ingen sure legemidler ble ekstrahert over i akseptorfasen i dette forsøket. I tillegg ble bobledannelse observert ved elektrodene i donor- og akseptorfasen. Dette kunne tyde på at strømføringen i den nye, modifiserte væskemembranen var for høy (se kapittel 4.1).

Tabell 6.1: Utbytte med ulike kunstige væskemembraner

Utbytte (%) ^a										
	Diflunisal	Fenolftalein	Flurbiprofen	Gemfibrozil	Hexobarbital	Ketoprofen	Naproxen	Pentymal	Probenecid	Warfarin
Anisole	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Brombenzen	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Caprylsyre	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Cyclopentanol	-	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-
1-dekanol	nd	nd	48	41	nd	36	31	nd	30	77
Diheksyleter	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Dodecylacetat	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
1-heksanol	13	2	46	41	38	22	9	36	49	9
1-heptanol	32	5	32	31	47	30	26	38	33	30
m-kresol	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
1-I-4-N	-	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd
Nitrobenzen	-	-	nd	nd	-	nd	nd	-	nd	nd
2-NPOE	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-nonanol	nd	1	66	56	4	20	18	2	53	29
1-oktanol	nd	2	47	37	15	28	24	11	45	31
2-oktanon	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Toluen	10	3	nd	nd	2	nd	nd	4	nd	nd
Tridecylfosfat	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-
Triheksylamin	nd	nd	-	-	nd	-	-	nd	-	-

^a(n=3)

1-I-4-N = 1-isopropyl-4-nitrobenzen

Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.1.2 Volum donorløsning

I et neste forsøk ble EMI utført med forskjellige volum av donorløsningen. I tillegg til et volum på 300 µl, ble det også gjort forsøk med volum på 500 og 1000 µl. De tre volumene inneholdt den samme totale mengden med analytter. Stoffblanding 1 ble benyttet i dette forsøket. Tabell 6.2 gir en oversikt over resultatene. Selv om kontaktflaten mellom den kunstige væskemembranen og donorløsningen ble større med økt donorum, viser tabellen at en økning i donorummet likevel ikke gav noe høyere utbytte av analyttene. Et donorum på 300 µl ble benyttet i resten av oppgaven.

Tabell 6.2: Utbytte med ulike volum av donorløsningen

Volum	Utbytte (%) ^a			
	Fenolftalein	Pentymal	Hexobarbital	Diflunisal
300 µl	4	19	26	39
500 µl	3	13	19	23
1000 µl	6	15	21	30

^a(n=3)

Elektrisk potensial: 15 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-oktanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

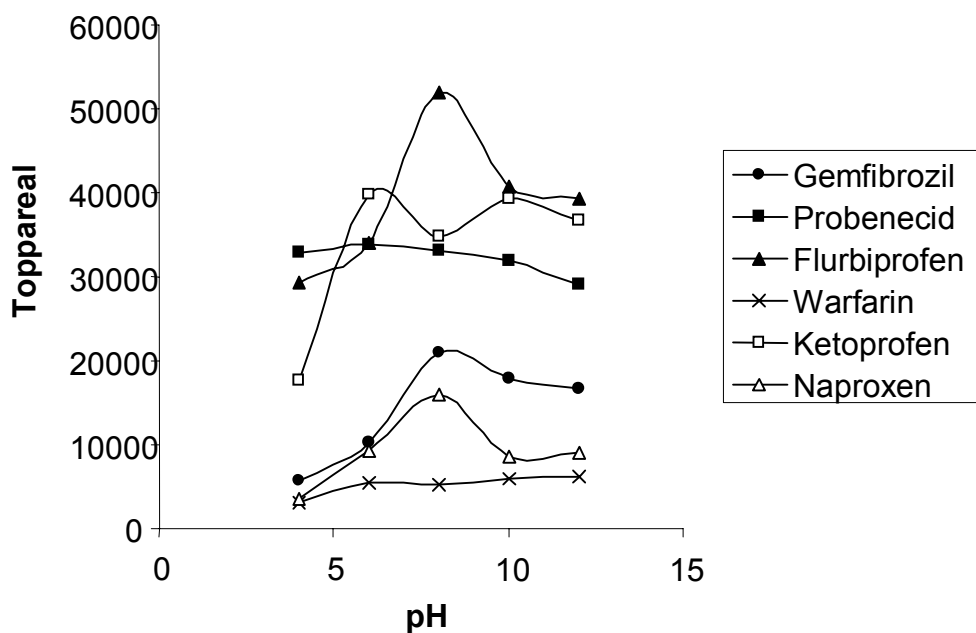
6.1.3 Polypropylenfiber

EMI og LPME av basiske legemidler hadde i tidligere forsøk gitt lite forurensninger i elektroferogrammene fra CE-apparatet [8-11, 16]. Dette gjaldt også ekstraksjoner fra kompliserte matrikser som plasma og urin, noe som kunne tyde på at den kunstige væskemembranen effektivt ekskluderte andre stoffer enn de basiske analyttene i donorløsningen. Forsøk med LPME av sure legemidler hadde derimot vist at forurensninger ble ekstrahert over i akseptorfase [17]. Det samme var tilfelle for de første forsøkene med EMI av sure legemidler i denne oppgaven. Elektroferogrammene fra CE-apparatet var vanskelige å tolke som følge av flere forurensningstopper. Noen av disse toppene interfererte i tillegg med legemiddeltoppene, noe som resulterte i usikkerhet i bergningen av ekstraksjonsutbyttene. Siden forsøkene med basiske analytter var vellykket, kunne det være grunn til å tro at polypropylenfiberen var tilsatt sure stoffer som ble ekstrahert ut av fiberen, og som på lik linje med de sure analyttene ble trukket mot den positivt ladde elektroden i akseptorløsningen. Det var trolig den sterkt basiske donor- og akseptorløsningen som var årsaken til at de sure tilsetningsstoffene ble ekstrahert ut av fiberen. Med ønske om å fjerne disse stoffene ble det forsøkt å vaske polypropylenfiberen før den ble benyttet i EMI. To ulike vaskemetoder ble testet ut: (1) Aceton-vask i 2 * 15 minutter og (2) NaOH- og etanolvask i 2 * 15 minutter. Fibrene ble deretter lufttørket, før de ble benyttet i EMI og sammenlignet med en uvasket fiber. Donorløsningen i dette forsøket bestod av ren NaOH. Ekstraksjonen med en uvasket fiber gav flere forurensningstopper i elektroferogrammet. De to andre elektroferogrammene inneholdt begge en forurensningstopp. Et nytt forsøk viste at denne toppen ikke interfererte med toppene fra legemidlene som ble benyttet i denne oppgaven. Polypropylenfiberen ble heretter vasket med aceton.

6.1.4 pH i donorfase og akseptorfase

Transporten av analytter fra donorfase, over membranen og inn i akseptorfase var avhengig av pH i de to vandige fasene. For at de sure legemidlene skulle være ioniserte, ble donorfase og akseptorfase gjort basiske. Elektrokinetisk migrasjon ble først utført med ulike pH-verdier i donorfase. Stoffblanding 2 og 3 ble benyttet i forsøket. Resultatene er vist i figur 6.1. Ved pH

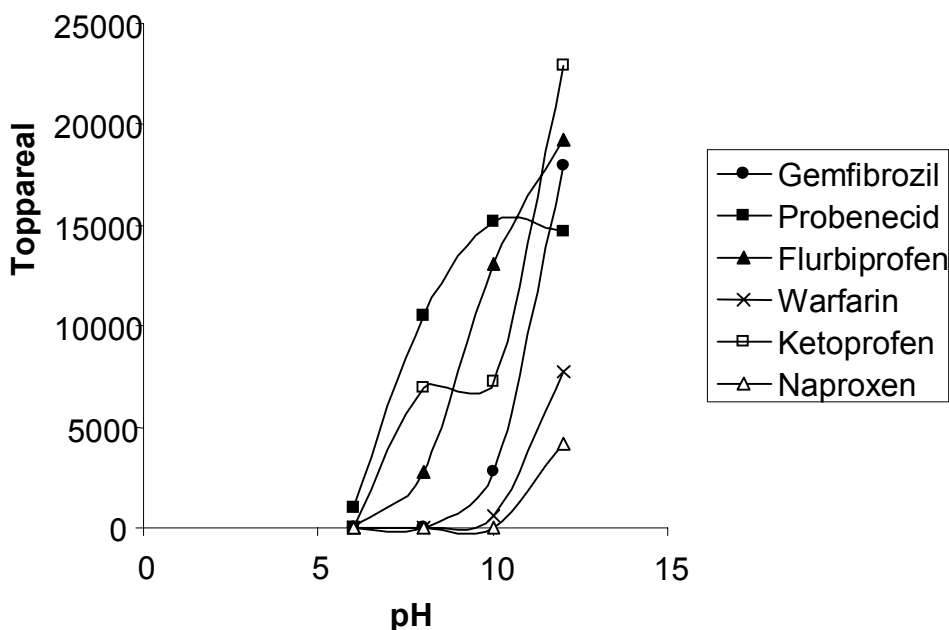
4,0 var utbyttene relativt lave for de fleste av de seks legemidlene som ble benyttet som analytter. Dette var ventet siden denne pH-verdien nærmet seg legemidlenes pK_a -verdi hvor de var bare delvis ioniserte. Ettersom pH-verdien i donorfasen økte, ble legemidlene fullstendig ioniserte og deres elektrokinetiske migrasjon forbedret. Dette resulterte i høyere utbytter. Det ble observert relativt små forandringer i utbyttet med en pH i donorfasen på over 6,0. Den elektrokinetiske prosessen så med andre ord ut til å være tilnærmet upåvirket av pH-variasjoner fra 6,0 og oppover for de fleste legemidlene. En 10 mM NaOH løsning med pH 12,0 ble brukt som donorfase i resten av oppgaven.



Figur 6.1: Effekt av pH i donorløsningen på utbyttet

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol.

Et lignende forsøk ble deretter utført med ulike pH-verdier i akseptorfase. Stoffblanding 2 og 3 ble benyttet som analytter. Resultatene er vist i figur 6.2. I dette forsøket var pH-effekten mer dramatisk. Ekstraksjonsprosessen viste seg å være svært sensitiv til pH-enderinger i akseptorfase. Ved pH 6,0 ble ingen legemidler ekstrahert over i akseptorfase (med unntak av probenecid med et utbytte på knappe 3 %) til tross for tilnærmet fullstendig ionisering av alle legemidlene. Ekstraksjonsutbyttene økte etter hvert som pH-verdien i akseptorfase ble høyere, men først ved pH 12,0 ble alle legemidlene ekstrahert over med maksimalt utbytte. Forsøket viste at en sterkt basisk akseptorfase var nødvendig for et godt resultat av den elektrokinetiske migrasjonen. En 10 mM NaOH løsning med pH 12,0 ble derfor brukt som akseptorfase i resten av oppgaven.



Figur 6.2: Effekt av pH i akseptorløsningen på utbyttet

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol.

Årsaken til at ekstraksjonsutbyttet var så sterkt avhengig av pH i akseptorfasen, kan forklares med reaksjonene som skjedde ved de to elektrodene under ekstraksjonsprosessen:

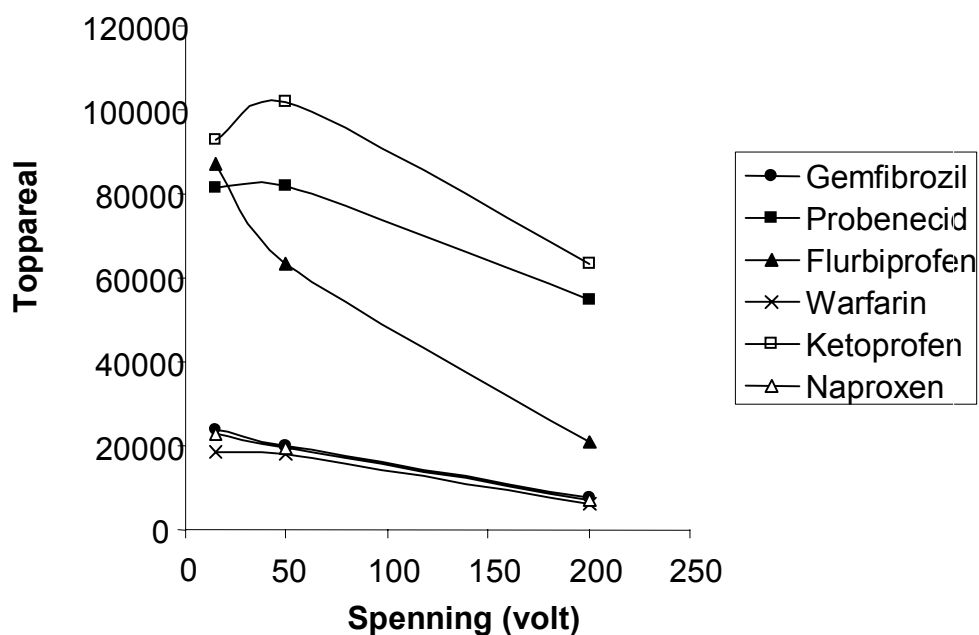
Donorfase (negativ elektrode): $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Akseptorfase (positiv elektrode): $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^-$

I akseptorfasen sank pH-verdien gradvis i løpet av ekstraksjonsprosessen fordi elektrolyse-reaksjonen i denne løsningen førte til dannelsen av H^+ ioner. For å motvirke denne effekten var det nødvendig med en høy pH-verdi som utgangspunkt for ekstraksjonen. Virkningen av H^+ ionene ble til en viss grad også forstørret på grunn av det lille volumet i akseptorløsningen (30 μL). I donorfase førte derimot elektrolyse-reaksjonen til en økning i pH-verdien, noe som var fordelaktig for ekstraksjonsprosessen. pH-verdien i denne løsningen var derfor ikke så kritisk.

6.1.5 Spenning

I et nytt forsøk ble ekstraksjonsutbyttet undersøkt som funksjon av påført spenning over den kunstige væskemembranen. Resultatene er sammenfattet i figur 6.3. Relativt høye utbytter ble oppnådd med bare 10 V som drivende kraft i systemet. Da styrken på spenningen ble økt til over 50 V, ble utbyttene fra ekstraksjonsprosessen lavere. En spenning på 200 V gav de laveste utbyttene. Tidligere forsøk på basiske legemidler har vist at noen stoffer (metadon og loperamid) migrerte best over i akseptorløsningen med 10 V som drivende kraft, mens andre stoffer (haloperidol, petidin og nortriptylin) trengte en spenning på 300 V for at ekstraksjonsutbyttet skulle bli maksimalt [11]. Det ser med andre ord ut til at det er individuelle forskjeller mellom stoffene som avgjør hvilken spenning som vil gi de høyeste utbyttene for hvert enkelt stoff.

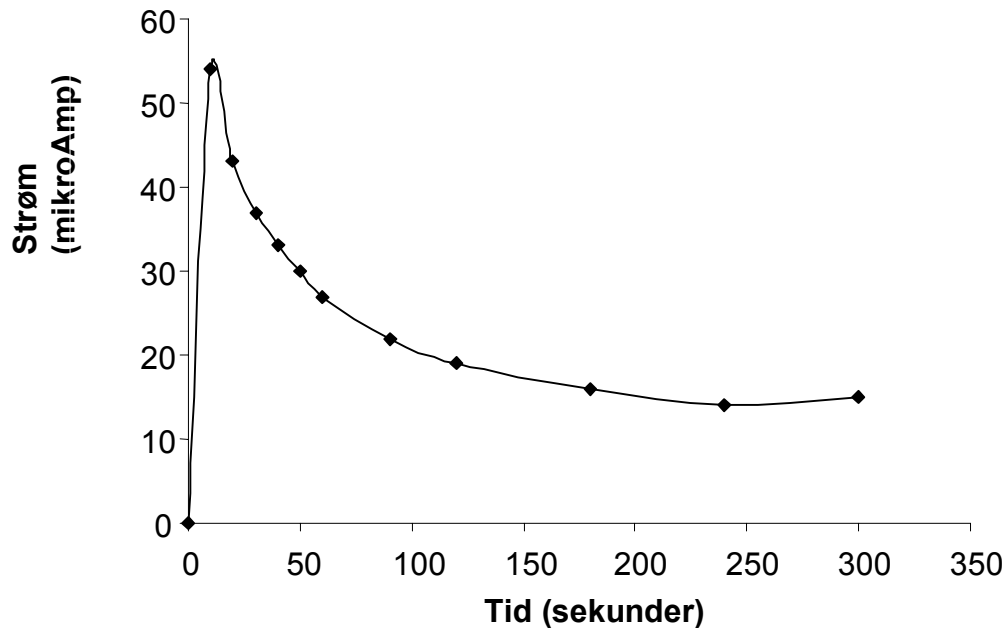


Figur 6.3: Effekt av spennning på utbytte

Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.1.5.1 Strøm

Som illustrert i figur 6.4, var strømmnivået i begynnelsen av ekstraksjonen omtrent 55 μA med en spennning på 50 V. I løpet av ekstraksjonsprosessen sank derimot nivået til 15 μA . Dette så ut til å være et passende strømmnivå. Høyere strømføring kunne resultert i elektrolyse, mens lavere strømføring kunne ført til undertrykking av ekstraksjonsprosessen.

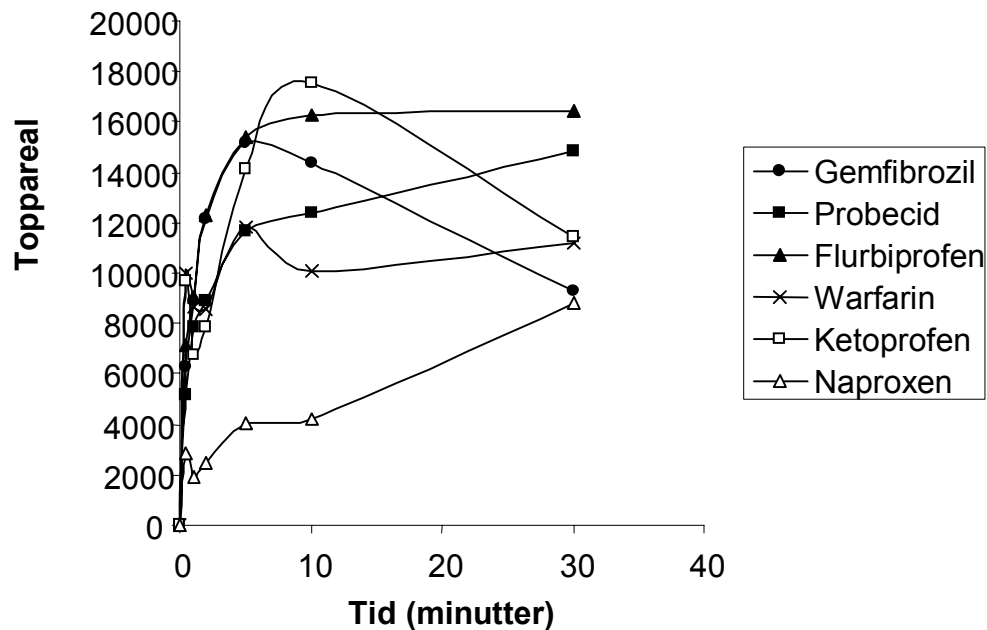


Figur 6.4: Strøm versus tid

Elektrisk potensial: 50 V; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.1.6 Tid

Ekstraksjonsutbyttet av legemidlene fra stoffblanding 2 og 3 ble også testet som funksjon av tid. Figur 6.5 viser resultatene fra dette forsøket. Utbyttene fra ekstraksjonen økte raskt som funksjon av tiden de første 5 minuttene, men etter 10 minutter ble ingen økning observert. For ketoprofen og gemfibrozil derimot, sank utbyttene kraftig i tiden mellom 10 og 30 minutter. Det samme fenomenet er tidligere vist for basiske legemidler [11]. Utflatningen av kurven kan skyldes at ekstraksjonssystemet nådde en likevekt, noe som igjen resulterte i en påfølgende tilbakediffusjon av legemidlene til den kunstige væskemembranen som følge av reversering av konsentrasjonsgradienten. I resten av denne oppgaven ble 5 minutter benyttet som ekstraksjonstid.



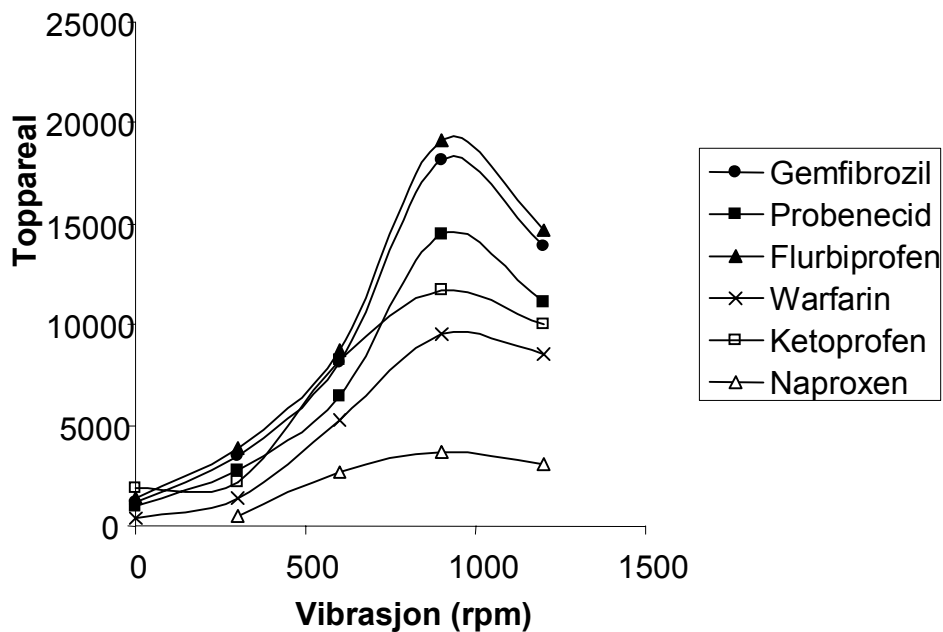
Figur 6.5: Effekt av tid på utbyttet

Elektrisk potensial: 50 V; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.1.7 Vibrasjon

Figur 6.6 viser resultatene fra et forsøk der ekstraksjonsutbyttet ble undersøkt som funksjon av vibrasjonshastighet. Stoffblanding 2 og 3 ble benyttet i forsøket. Som figuren illustrerer, er den elektrokinetiske migrasjonen svært avhengig av vibrasjon av ekstraksjonsenheten. I et stillestående system ble ketoprofen ekstrahert over i akseptorfasen med et utbytte på knappe 4 %, mens de fem andre legemidlene fikk enda lavere utbytter. Etter hvert som vibrasjonshastigheten ble høyere, økte derimot ekstraksjonsutbyttene betraktelig. De beste utbyttene ble oppnådd med en vibrasjonshastighet mellom 900 og 1200 rpm. Ved hastigheter over dette ble ekstraksjonsutbyttene lavere, muligens som følge av bobledannelse i donor- og akseptorfasen etter for sterk vibrasjon. Det at vibrasjonshastigheten virket så sterkt inn på resultatene, styrket

teorien om at grenseflaten mellom organisk fase og donorløsningen fungerte som en barriere og kontrollerte ekstraksjonshastigheten (se kapittel 4.1). Vibrasjon av systemet reduserte tykkelsen av stillestående væske langs hulfiberen og forenklet migrasjonen inn den organiske fasen.



Figur 6.6: Effekt av vibrasjonshastighet på utbyttet

Elektrisk potensial: 50 V; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.1.8 Temperatur

EMI har tidligere bare blitt utført i romtemperatur. Som et siste optimaliseringsforsøk var det derfor ønskelig å undersøke effekten av ulike temperaturer i donorløsningen på ekstraksjonsutbyttet. Også i dette forsøket ble stoffblanding 2 og 3 benyttet. Ekstraksjonstiden var på 5 minutter, styrken på spenningen var 50 V, vibrasjonshastigheten var på 1200 rpm, 1-heptanol utgjorde den kunstige væskemembranen og pH i donor- og akseptorløsningen var 12,0. Sju ulike temperaturer ble testet; 15, 20, 25, 30, 35, 40 og 45 °C. Noe overraskende varierte utbyttene lite med forandringer i temperaturen. Dette gjaldt for alle de seks legemidlene. Romtemperatur ble benyttet i resten av oppgaven.

6.1.9 Massebalanse

Legemidlene som ble brukt som analytter i denne oppgaven, migrerte i varierende grad fra donorløsningen, over den kunstige væskemembranen og inn i akseptorløsningen. Selv om ekstraksjonsbetingelsene var helt like, kunne ekstraksjonsutbyttene variere fra relativt lave for warfarin til svært høye for flurbiprofen og probenecid. Dette kunne skyldes at grenseflatene mellom (1) organisk fase og donorfase og/eller (2) organisk fase og akseptorfase for noen av analyttene virket som en vanskeligere overgang enn for andre (se kapittel 4.1). For å undersøke hvor analyttene som ikke migrerte over i akseptorløsningen befant seg, ble det i et forsøk også målt analyttkonsentrasjon i donorløsningen etter endt ekstraksjon. Resultatene muliggjorde dannelsen av en massebalanse for trefasesystemet, som vist i tabell 6.3. Som tabellen illustrerer, var prøveløsningen nesten totalt strippet for legemidler. Analyttene fordelte seg mer eller mindre jevnt mellom organisk fase og akseptorløsningen. Dette viste at det hovedsaklig var overgangen mellom organisk fase og akseptorløsningen som vanskeliggjorde den elektrokinetiske migrasjonen og begrenset ekstraksjonsutbyttene. Forsøket gav ingen svar på hva som var årsaken til at noen av legemidlene taklet denne overgangen bedre enn andre. De små forskjellene i legemidlenes molekylvekt, pK_a - og log P verdier (se tabell 5.1) burde teoretisk gitt ganske like utbytter av EMI.

Tabell 6.3: Massebalanse etter 5 minutter med EMI

Analytter	Utbytte (%) ^a		
	Prøveløsning	Organisk fase	Akseptorløsning
Flurbiprofen	2	49	49
Gemfibrozil	3	61	36
Ketoprofen	9	49	42
Naproxen	8	54	38
Probenecid	4	45	51
Warfarin	3	75	22

^a(n=5)

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.2 Utbytte og oppkonsentreringsfaktor i et optimalt system

Etter at de innledende forsøkene var ferdige og betingelsene for EMI av sure legemidler var optimalisert, ble systemet testet på 11 ulike legemidler. Som vist i tabell 6.4 migrerte alle de sure legemidlene over i akseptorfasen. Ekstraksjonsutbyttene varierte fra 8 til 100 %. Dette betydde at EMI med riktige betingelser (spenning, tid, vibrasjonshastighet etc.), kunne fungere bra for sure legemidler generelt, og ikke bare for de legemidlene som ble benyttet i de fleste forsøkene i denne oppgaven. Siden ekstraksjonene ble utført fra en donorløsning med volum 300 µl til en akseptorløsning med volum 30 µl, var den maksimale oppkonsentreringsfaktoren i systemet lik 10. Som man kan se i tabell 6.4 varierte faktoren i dette systemet fra 0,8 (ingen oppkonsentrering) til 10,0 (maksimal oppkonsentrering).

Analyttenes molekylvekt, pK_a - eller $\log P$ verdier (se tabell 5.1) virket ikke inn på resultatene. Det er derfor trolig at andre parametere påvirket den elektrokinetiske migrasjonen til de sure legemidlene. Utbyttene i forsøket ble som vist i tabell 6.4 oppnådd etter 5 minutter med ekstraksjon. Som diskutert tidligere (kapittel 6.1.6) førte lengre ekstraksjonstid ikke til noen økning av utbyttene. Massebalansen (tabell 6.3) viste derimot at overgangen fra organisk fase til akseptorfase var et kritisk steg i ekstraksjonsprosessen. Siden variasjonene i utbytte sannsynligvis kom av analyttenes egenskap til å migrere mellom disse to fasene, vil denne egenskapen bli en viktig parameter for å bestemme ekstraksjonsutbyttene og oppkonsentreringsgraden av de sure legemidlene.

Tabell 6.4: Utbytte etter 5 minutter med elektrokinetisk migrasjon

Analytt	Utbytte (%)	Oppkonsentreringsgrad
Diclofenac ²	74	7,4
Fenoprofen ²	100	10,0
Flurbiprofen ¹	86	8,6
Gemfibrozil ¹	48	4,8
Hexobarbital ²	8	0,8
Ibuprofen ²	61	6,1
Indometacin ²	34	3,4
Ketoprofen ¹	82	8,2
Naproxen ¹	25	2,5
Probenecid ¹	91	9,1
Warfarin ¹	11	1,1

¹(n = 15), ²(n = 4)

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

6.3 Evaluering

Det er vanlig at en analysemetode må valideres for å sikre at den er egnet til å utføre den oppgaven den er ment å utføre. Dette gjøres for å kvalitetssikre de resultatene analysen gir, og det er flere kriterier for dokumentasjon av metodens egenskaper og pålitelighet. To av disse kriteriene er repeterbarhet og linearitet. Siden denne oppgaven er det eneste arbeidet som er utført på EMI av sure legemidler, og EMI på langt nær er en ferdig utviklet analysemetode, ble det i denne oppgaven kun gjort en kort evaluering med hensyn på repeterbarhet og linearitet. Tre av de sure legemidlene ble ekstrahert i et optimalt system. Resultatene er vist i tabell 6.5. Et elektroferogram fra forsøket er vist i figur 6.7.

Tabell 6.5: Repeterbarhet og linearitet

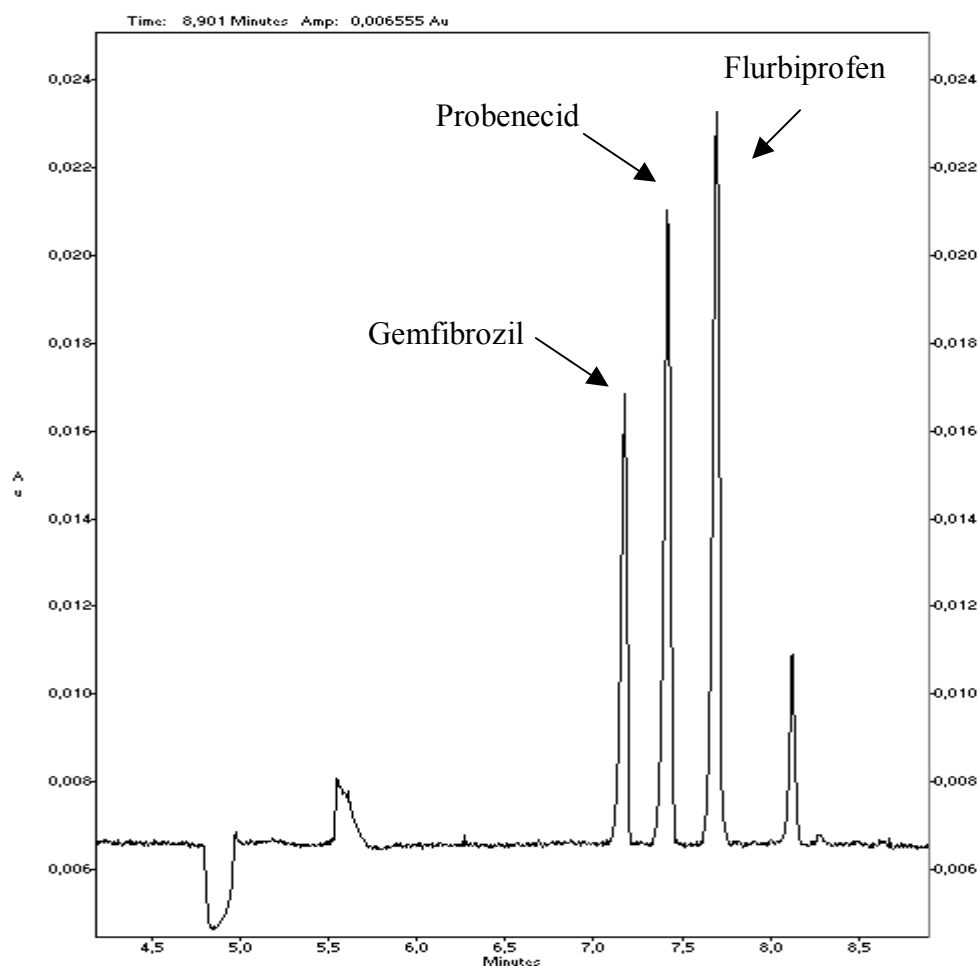
Analytt	Repeterbarhet (% RSD) (n=15, 1 µg/ml)	Linearitet (r^2) (0,1 – 2,5 µg/ml)
Probenecid	8	1,00
Flurbiprofen	12	0,98
Gemfibrozil	29	0,96

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i donor- og akseptorløsning: 12,0.

Linearitet er egenskapen en metode har til å gi standardkurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjon innenfor et gitt konsentrasjonsområde. Korrelasjonskoeffisienten (r^2) bør være 0,999 [18], men lavere verdier kan aksepteres avhengig av hva metoden skal brukes til. Repeterbarheten angir en analysemetodes spredning (i forsøk som er utført på samme dag og i samme laboratorium) og kan benevnes med % RSD (relativt standardavvik). I bioanalyse med kompliserte matrikser kan RSD opp mot 10 % godtas [18].

Som vist i tabell 6.5 ble resultatene fra evalueringen lavere enn det som er anbefalt. Med tanke på hvor lite forskning som er gjort på EMI og at alt utstyret som ble brukt i denne oppgaven var hjemmelaget, må repeterbarhet- og linearitetsverdiene for probenecid og flurbiprofen (utbytter på henholdsvis 91 og 86 %) derfor betegnes som akseptable. For gemfibrozil, som ble ekstrahert i mindre grad enn de to andre legemidlene (utbytte 48 %), ble både repeterbarhet- og linearitetsdataene noe svakere. Det finnes foreløpig ingen forklaring på disse resultatene, men det kan tenkes at mengden legemiddel som migrerte over i akseptorfasen (utbytte) virket inn på RSD og linearitet. Det var en trend gjennom hele oppgaven at de legemidlene som hadde høyest utbytte ved optimale betingelser, også gav ganske høye utbytter med dårligere betingelser. Legemidlene med lave utbytter trengte derimot optimale forhold for å gi utbytter i det hele tatt. Disse legemidlene hadde sannsynligvis store problemer med å migrere fra organisk fase og inn i akseptorfase, og hvor stor andel av legemiddelet som migrerte varierte i tillegg mellom hver ekstraksjon. RSD ble derfor høyere for disse legemidlene. Det er også tenkelig at analyttkonsentrasjonen i løsningen spilte en større rolle for disse stoffene, og på den måten påvirket linearitetsdataene.

Et elektroferogram av en akseptorløsning etter endt ekstraksjon med et optimalt EMI-system er vist i figur 6.7. Figuren viser at de tre legemidlene hadde blitt ekstrahert fra donorløsningen, over den kunstige væskemembranen og inn i akseptorløsningen ved tilførsel av elektrisk spenning. I denne ekstraksjonen ble utbyttene 50 % (gemfibrozil), 96 % (probenecid) og 94 % (flurbiprofen). Som figuren illustrerer var det en forurensning i akseptorløsningen. Denne kom ut som en egen topp etter legemiddeltoppene i elektroferogrammet. Forurensningen skyldtes trolig et surt tilsetningsstoff i polypropylenfiberen som ikke ble vasket ut med aceton (se kapittel 6.1.3).



Figur 6.7: Elektroferogram

6.4 Biologiske prøver

Forsøkene i denne oppgaven har hittil blitt utført med vandige donorløsninger. EMI av basiske analytter har vist at ekstraksjon også er mulig fra biologiske væsker [11]. Fem basiske legemidler ble isolert fra både plasma og urin, med ekstraksjonsutbytter som var sammenlignbare med

utbyttene oppnådd med vandige donorløsninger. Få forurensningstopper i de tilhørende elektroferogrammene kunne tyde på at endogene substanser effektivt ble ekskludert og blokkert av den kunstige væskemembranen. Som et siste eksperiment i denne oppgaven ble det forsøkt å isolere sure legemidler fra urin og plasma.

6.4.1 Ekstraksjon fra urin

En voksen person utskiller 1,2 – 1,5 liter urin i døgnet. Denne urinen vil normalt inneholde omtrent 50 gram tørrstoff hvorav urea, urinsyre, kreatinin og NaCl utgjør hovedkomponentene. Urin skal normalt ikke inneholde stoffer med stor molekylvekt (som proteiner), men den inneholder en rekke endogene substanser i tillegg til de fire som er nevnt over. Konsentrasjonen av disse stoffene kan variere fra person til person [18].

I et første forsøk ble 150 μ L urin tilsatt 150 μ L standardløsning av stoffblanding 2 fortynnet med 20 mM NaOH. Dette gav en konsentrasjon på 10 mM NaOH i prøveløsningen. Det ble ekstrahert tre ganger fra denne prøveløsningen (urin med legemiddel), to ganger fra urin uten legemiddel og tre ganger fra en vandig donorløsning med legemiddel. Ekstraksjonsbetingelsene var optimale (Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i akseptorløsning: 12,0). Elektroferogrammene som viste ekstraksjon fra urin uten legemiddel, inneholdt flere forurensningstopper. Dette kunne tyde på at endogene substanser fra urinen hadde migrert over i akseptorfasen. De samme toppene dominerte i elektroferogrammene som viste ekstraksjon fra urin med legemiddel. Ingen legemiddeltopper var synlige. Ekstraksjonene fra den vandige donorløsningen resulterte i rene elektroferogrammer. Disse resultatene tatt i betraktning kunne det se ut som at noen endogene substanser påvirket og hemmet ekstraksjonen av legemidler fra urinen. Siden EMI av basiske legemidler fra urin var vellykket [11], var disse endogene substansene trolig negativt ladet. For å undersøke hvilke stoffer dette kunne være, ble det laget donorløsninger av urea, urinsyre, NaCl og kreatinin. Konsentrasjonen av de ulike stoffene i donorløsningen er vist i tabell 6.6.

Tabell 6.6: Konsentrasjon av endogene substanser

Substans	Konsentrasjon i donorløsning
Urea	3,64 mg/ml
Urinsyre	0,084 mg/ml
Kreatinin	0,392 mg/ml
Cl ⁻	26,8 mM

Resultatene fra forsøket med ulike endogene substanser i donorløsningen er vist i tabell 6.7. Det var bare ekstraksjonene med urea og urinsyre i donorløsningen som gav topper i elektroferogrammene. En t-test med konfidensnivå 95 % viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom ekstraksjonsutbyttene som ble oppnådd med en donorløsning av urea eller urinsyre, og utbyttene som ble oppnådd med en vandig donorløsning. Det var derfor lite sannsynlig at det var disse to endogene substansene i urinen som skapte problemer for EMI.

Tabell 6.7: Utbytte med ulike endogene substanser i donorløsningen

	Utbytte (%) ^a		
	Warfarin	Ketoprofen	Naproxen
Vann	21	74	25
Urea	21	77	23
Urinsyre	24	51	31
Kreatinin	nd	nd	nd
NaCl	nd	nd	nd

^a(n=2)

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i akseptorløsning: 12,0.

Donorløsningene med NaCl og kreatinin hadde derimot en inhiberende effekt på ekstraksjonen. Disse endogene stoffene påvirket den elektrokinetiske migrasjonen av de sure legemidlene, og ingen legemiddeltopper ble observert i de tilhørende elektroferogrammene. Det er trolig at en blanding av flere endogene substanser i samme donorløsning, som er tilfellet med urin, har en sterkere inhiberende effekt på EMI enn donorløsninger med enkeltsubstanser som ble testet i dette forsøket.

6.4.1.1 Påvirkning av NaCl i donorfase og akseptorfase

For å undersøke hvor mye ekstraksjonsutbyttene var avhengige av saltkonsentrasjonen i prøven, ble ulike mengder NaCl tilsatt prøvene før ekstraksjon. I et første forsøk ble det laget vandige donorløsninger med 1 mM, 10 mM og 100 mM NaCl-konsentrasjoner. Det ble også ekstrahert fra en vandig donorløsning uten tilsatt salt. Akseptorløsningen var en vanlig 10 mM NaOH-løsning pH 12,0. Resultatene er vist i tabell 6.8.

Tabell 6.8: Utbytte med ulik saltkonsentrasjon i donorløsningen

	Utbytte (%) ^a		
	Warfarin	Ketoprofen	Naproxen
0 mM	8	64	16
1 mM	7	68	15
10 mM	11	59	17
100 mM	nd	nd	nd

^a(n=3)

Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i akseptorløsning: 12,0.

Det var bare fra donorløsningene med 0 mM, 1 mM og 10 mM NaCl-konsentrasjon at legemidlene migrerte over i akseptorløsningen. En t-test med konfidensnivå 95 % viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom ekstraksjonsutbyttene. Dette kunne tyde på at det var NaCl i høye konsentrasjoner som påvirket ekstraksjonen av de sure analyttene i donorløsningen.

En teori var at Cl^- ble ekstrahert over i akseptorfasen, og at dette førte til hemming av de andre analyttenes migrasjon. I et neste forsøk ble det laget akseptorløsninger med 1 mM, 10 mM og 100 mM NaCl-konsentrasjoner. Hensikten var å undersøke om høye saltkonsentrasjoner i akseptorfasen ville motvirke ekstraksjonen av Cl^- fra donorløsningen og på den måten øke legemidlenes ekstraksjonsutbytter. Løsningen med 100 mM NaCl-konsentrasjon som ikke gav utbytter i det forrige forsøket (se tabell 6.8) ble benyttet som donorløsning. Selv om akseptorløsningene inneholdt NaCl ble det kun observert migrasjon av legemidler til akseptorløsningen med 1 mM NaCl-konsentrasjon. Det er sannsynlig at saltkonsentrasjonen i både donor- og akseptorløsningen påvirket EMI, men det må mer forskning til for fullt ut å kunne forstå hvordan og hvorfor dette skjer.

6.4.2 Ekstraksjon fra plasma

Blod er en suspensjon av blodceller i en væske som kalles plasma. Omtrent 45 % av det totale blodvolumet er blodceller, mens plasma utgjør de resterende 55 %. Plasma, som er en svakt alkalisk væske (pH 7,4), er den vanligste biologiske matriksen i analytisk sammenheng [2, 18]. Den kan isoleres fra blod etter tilsetning av antikoagulant og en påfølgende sentrifugering. Plasma må oppbevares nedfrosset siden det ikke er bakteriologisk og kjemisk stabilt. I motsetning til urin inneholder plasma flere proteiner, noe som ofte skaper problemer i analysesammenheng fordi de fleste legemidler er proteinbundet. I tillegg kan plasmaproteinene tette igjen kapillærrør eller kolonner, og dermed ødelegge ulike separasjonssystem.

I et første forsøk ble 150 μL plasma tilsatt 150 μL standardløsning av stoffblanding 2 fortynnet med 20 mM NaOH. Dette gav en konsentrasjon på 10 mM NaOH og en pH på omtrent 11 i prøveløsningen. Det ble ekstrahert tre ganger fra denne prøveløsningen (plasma med legemiddel), to ganger fra plasma uten legemiddel og tre ganger fra en vandig donorløsning med legemiddel. Ekstraksjonsbetingelsene var optimale (Elektrisk potensial: 50 V; Ekstraksjonstid: 5 minutter; Vibrasjonshastighet: 1200 rpm; Kunstig væskemembran: 1-heptanol; pH i akseptorløsning: 12,0). Ekstraksjonene fra den vandige donorløsningen resulterte i rene elektroferogrammer. Det ble derimot ikke oppnådd migrasjon av legemidler med plasma som donorløsning. I stedet ble det observert utfelling av plasma langs polypropylenfiberen underveis i ekstraksjonen, noe som førte

til at strømmen i systemet økte. Det kunne tenkes at utfellingen av plasma skyldtes den høye pH-verdien (~11) i plasmaløsningen. I et neste forsøk ble det derfor laget to ulike donorløsninger med plasma som begge hadde en lavere pH. Siden plasma har god bufferkapasitet, ble pH i de to løsningene nesten lik plasmas egen pH (7,4). I den ene løsningen ble 150 µL plasma tilsatt 150 µL standardløsning fortynnet med fosfatbuffer pH 4,0, noe som gav en pH på omtrent 7 i donorløsningen. I den andre løsningen ble 150 µL plasma tilsatt 150 µL standardløsning fortynnet med rent vann, noe som gav en pH på omtrent 7 i donorløsningen. Forsøket viste at pH-reduksjonen ikke gav noen forbedring når det gjaldt utfelling.

Selv om det ble observert utfellinger i ekstraksjonsforsøkene med plasma som donorløsning, ble alle akseptorløsningene likevel undersøkt for spor av legemidler i CE-apparatet. Ingen ekstraksjonsutbytter kunne derimot beregnes, da det ikke var mulig å tolke de tilhørende elektroferogrammene på grunn av forurensinger i akseptorløsningene. Plasma har i tidligere forsøk vist seg som en god donorløsning for EMI av basiske legemidler [11]. Denne oppgaven har vist at det samme ikke er tilfellet for EMI av sure legemidler. Det må mer forskning til før man kan trekke en konklusjon om hvorfor det er en forskjell mellom disse to legemiddelgruppene og bruken av plasma som donorløsning. En teori er likevel at plasseringen av elektrodene (som er motsatt for sure og basiske legemidler) kan påvirke plasmaproteinene og føre til utfelling av disse langs polypropylenfiberen.

7 KONKLUSJON

Denne oppgaven har for første gang vist at det er mulig å ekstrahere sure legemidler fra en donorløsning, over en kunstig væskemembran og inn i en akseptorløsning ved tilførsel av elektrisk spenning. EMI av sure legemidler er en svært rask prosess, med ekstraksjonstider på kun 5 minutter. I tillegg kreves det bare små volum (μl) med organisk løsningsmiddel til å utgjøre den kunstige væskemembranen. Valget av organisk løsningsmiddel viste seg å være kritisk, og en kunstig væskemembran bestående av langkjedete alkoholer gav de høyeste ekstraksjonsutbyttene i denne oppgaven. Legemidlenes elektrokinetiske migrasjon kunne optimaliseres ved å benytte riktig pH-verdi i donor- og akseptorløsningen, og ved å velge rett spenningsstyrke, ekstraksjonstid og vibrasjonshastighet.

Selv om EMI fra vandige donorløsninger gav lovende resultater, viste forsøk i denne oppgaven at tilfelle ikke var det samme med EMI fra biologiske matrikser. Det kreves mer forskning før EMI kan benyttes til ekstraksjon av sure legemidler fra plasma og urin. Mer arbeid er også nødvendig for fullt ut å kunne forstå prosessen som skjer ved elektrokinetisk migrasjon. Konseptet kan bli viktig i fremtidig analytisk kjemi for isolering, fraksjonering og oppkonsentrering. Særlig innen miniatyriserte analytiske systemer kan dette nye konseptet ha en framtid.

8 REFERANSELISTE

- [1] Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE: *Kromatografi*. Universitetsforlaget, 1998; 3rd edition.
- [2] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget, 2004
- [3] Jeannot MA, Cantwell F: *Solvent Microextraction into a Single Drop*. Analytical Chemistry 1996, **68**(13):2236-2240.
- [4] Jeannot MA, Cantwell F: *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle*. Analytical Chemistry 1997, **69**(2):235-239.
- [5] He V, Lee HK: *Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe*. Analytical Chemistry 1997, **69**(22):4634-4640.
- [6] Zhao L, Lee HK: *Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water*. Journal of Chromatography A 2001, **919**(2):381-388.
- [7] Zhao L, Lee HK: *Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization*. Journal of Chromatography B 2001, **760**(1):27-36.
- [8] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry 1999, **71**(14):2650-2656.
- [9] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B 2005, **817**(1):3-12.
- [10] Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S: *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2004, **23**(1):1-10.
- [11] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A 2006, **1109**(2):183-190.
- [12] Stichlmair J, Schmidt J, Proplesch R: *Electroextraction: A novel separation technique*. Chemical Engineering Science 1992, **47**(12):3015-3022.

- [13] Luo GS, Pan S, Liu JG, Dai YY: *Liquid-Liquid Phase equilibrium under external electric fields*. Separation science and technology 2001, **36**(12):2799-2809.
- [14] Berduque A, Arrigan D: *Selectivity in the Coextraction of Cation and Anion by Electrochemically Modulated Liquid-Liquid Extraction*. Analytical Chemistry 2006, **78**(8):2717-2725.
- [15] Cheng Y, Schiffrin DJ: *A study of 2-heptanone and 2-octanone as solvents for two-phase electrochemistry: Part 2. Facilitated ion transfers*. Journal of Electroanalytical Chemistry 1997, **429**(1-2):37-45.
- [16] Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S: *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A 2006, **1124**(1):29-34.
- [17] Johansen TP; *Væskefase mikroekstraksjon av sure legemidler*. 2002, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- [18] Rasmussen KE: *Bioanalyse og validering av analysemetoder*; 2002, Oslo, Norge: Unipub AS.